

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-504200

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)5月19日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 Q 1/66		6807-4B	
C 0 7 H 1/08		7822-4C	
C 1 2 Q 1/68	Z	7823-4B	
// C 0 7 H 19/20		7822-4C	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平4-502774
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)1月10日
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)7月9日
 (86) 国際出願番号 PCT/GB92/00056
 (87) 国際公開番号 WO92/12253
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)7月23日
 (31) 優先権主張番号 9100551.2
 (32) 優先日 1991年1月10日
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), JP, US

(71) 出願人 アマーシャム・インターナショナル・ピーエルシー
 イギリス国バッキンガムシャー エイチビー7・9エヌエイ, リトル・チャルフォント, アマーシャム・プレイス (番地なし)
 (72) 発明者 ランディン, アーン
 スウェーデン王国エスー130 54 ダラロ, ストランドバーゲン 36
 (72) 発明者 アンソン, ジョン・ジョージ
 イギリス国カーディフ シーエフ1・9ジエイダブリュー, ポントカナ, フェアリー・ロード 65
 (74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

(54) 【発明の名称】 細胞内成分の抽出法

(57) 【要約】

細胞を抽出剤と接触させて抽出物溶液を形成させることよりなる細胞内成分抽出物の調製方法において、該溶液をサイクロデキストリンと接触させて抽出剤を中和することを特徴とする方法。好ましい抽出剤はカチオンまたは他の種類の界面活性剤である。サイクロデキストリンは好ましくは溶液状で使用される。好ましい細胞内成分は、抽出剤の中和後にホタルルシフェラーゼアッセイ法によりアッセイしうるATP；界面活性剤の中和後に増幅または他の方法で後続処理されるDNAまたはRNAである。

請求の範囲

1. 細胞内成分および膜成分を抽出するために用いた物質を含有する溶液を供給することにより細胞内成分の抽出物を調製する方法において、該溶液を抽出物質の中和のために適切な種類および適切な量のサイクロデキストリンまたはサイクロデキストリン誘導体と接触させることを特徴とする方法。
2. 溶液が細胞を抽出物質と接触させることにより供給される、請求の範囲第1項に記載の方法。
3. サイクロデキストリンが溶液状態で使用される、請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。
4. サイクロデキストリンが抽出物質より化学量論的に過剰に使用される、請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の方法。
5. サイクロデキストリンが α -サイクロデキストリン、 β -サイクロデキストリンまたは γ -サイクロデキストリンである、請求の範囲第1項ないし第4項のいずれかに記載の方法。
6. 抽出物質がノニオン、アニオン、カチオンまたはツビターイオン界面活性剤、またはそれらの界面活性剤の混合物である、請求の範囲第1項ないし第5項のいずれかに記載の方法。
7. 細胞内成分がATPである、請求の範囲第1項ないし第6項のいずれかに記載の方法。
8. 抽出物中の細胞内成分が酵素アッセイされる、請求の範囲第1項ないし第7項のいずれかに記載の方法。
9. 酵素アッセイがホタルルシフェラーゼ反応に基づくものである、請求の範囲第1項ないし第8項のいずれかに記載の方法。
10. 細胞内成分がDNAまたはRNAである、請求の範囲第1項ないし第6項のいずれかに記載の方法。
11. 抽出されたDNAまたはRNAが増幅または複製による発露もしくは制限処理により後処理される、請求の範囲第10項に記載の方法。
12. 酵素アッセイまたは後処理がサイクロデキストリンまたは誘導体の存在

明細書

細胞内成分の抽出法

本発明は、細胞内代謝産物を含めた細胞内成分の抽出法に関するものである。本発明は、細胞から成分を抽出するために用いられる多くの物質が抽出された成分につき実施されるアッセイその他の処理工程を妨害するという問題に対処するものである。本発明は抽出物質を中和するためにサイクロデキストリンを用いる。本発明による一例においては、細胞内代謝産物がアデノシン三リン酸(ATP)であり、これは抽出剤を中和したのちホタルルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を利用してアッセイすることができる。他の例においては、細胞内成分が核酸であり、これは抽出剤を中和したのち増幅するか、または他の方法で後処理することができる。

細胞内成分抽出の一般的観点

生物学的試料中の細胞内成分のアッセイは、しばしば酵素法により行われる。それらの方法は下記を必要とする：1) 成分をアッセイに添加される酵素系に利用される状態にするために、成分を細胞から放出させること。2) 抽出物の調製、保存またはアッセイに際してそれらの成分に作用する可能性のある細胞由来の酵素を失活させること。細胞内成分の抽出は、細胞壁および細胞膜を開放し、かつ代謝産物プール全体を周囲の媒質中へ放出させることを伴う。細胞内においては、代謝産物プールはしばしば細胞内酵素の作用のため数秒程度の代謝回転時間を有する。抽出剤が膜のインテグリティに作用し始めると直ちに、生じた作用に対して細胞の酵素系が対抗しようとする。従って、時間を要する抽出期間中にかなりの代謝産物水準の変化が起こる可能性がある。このため、最良の酵素アッセイ法を用いたとしても、細胞内代謝産物水準に関する全く誤ったデータが得られることは明らかである。この問題を避ける唯一の方法は、迅速に細胞膜を開放し、同時に、細胞内成分に作用する酵素をすべて失活させる抽出剤を用いることである。従って酵素の失活は信頼性のあるすべての抽出剤本来の特性である。細胞壁の存在は細胞を抽出剤から保護し、細胞、細胞膜および基質細胞を特に抽出困難に

在下で実施される、請求の範囲第8項、第9項または第11項に記載の方法。

13. 請求の範囲第1項ないし第9項のいずれかに記載の方法により生物試料中のATPを抽出およびアッセイするためのキットにおいて、下記の構成成分：

- a) 抽出物質(他の成分と分離して保存)
- b) サイクロデキストリン、
- c) ホタルルシフェラーゼ試薬、
- d) アッセイ用緩衝液

を含むキット。

14. - 抽出物質が、流体試料と接触した後に適切なサイズの試料を捕獲するキャリアー上または中において乾燥されており、

- サイクロデキストリンがアッセイ用緩衝液に溶解されており、

- ホタルルシフェラーゼ試薬が、該試薬をアッセイ用緩衝液中へ放出しうるキャリアー上または中において乾燥されている、

請求の範囲第13項に記載のキット。

している。従ってこれらの種類の細胞の抽出には、トリクロロ酢酸(TCA)または過塩素酸(PCA)などのカオトロピック(chotropic)アニオンを含む強酸がしばしば用いられる。これらの物質は強力な酵素失活作用を有し、アッセイ前に抽出物が著しく希釈されない限り必然的に酵素アッセイを妨害する。抽出物の希釈は、低濃度の代謝産物のアッセイを困難にする。

中間代謝産物の代謝回転速度が速いほど、抽出剤添加時に細胞内酵素を直ちに失活させる必要性はますます高くなる。この観点からみて、ATPは最も抽出困難な細胞内代謝産物の1つである。すべての細胞において、ATPはエネルギー産生反応からエネルギー要求反応へエネルギーを伝達する手段である。従って多種類のATP変換酵素(キナーゼおよびATPase)が存在し、高い活性を有する。膜のインテグリティがたとえば抽出剤によってわずかに損傷を受けたとしても、細胞内代謝産物およびイオンが急速に失われる。細胞がこれらの事象を補償しようとするのに伴って、大量のATPが消費される。本発明に至る研究の目的の1つは、ホタルルシフェラーゼアッセイ法と適合する、信頼性のある微生物ATP抽出法を開発することであった。微生物細胞においてはATP代謝回転速度が高く、かつ厚い細胞壁が存在するため、微生物ATPの抽出法はすべての種類の細胞における他の大部分の細胞内代謝産物にも有効なものになると思われる(抽出剤自身が代謝産物を分解しない限り)。さらにATPのホタルルシフェラーゼアッセイ法においては反応速度が測定される。すなわちホタルルシフェラーゼは反応速度アッセイ法の一例である。従って抽出中または抽出後に添加される阻害剤はいずれもアッセイに影響を及ぼすであろう。ホタルルシフェラーゼの活性は、単純な塩類を含めて多種多様な化合物により阻害される。またホタルルシフェラーゼは狭い最適pHをもつ。従ってホタルルシフェラーゼに有効な抽出法は、他の大部分の酵素アッセイ法にも有効なものになると思われる。これは特に、単にアッセイ時間の延長によって阻害を補償しうる終了点アッセイ法のいずれについても言える。

DNAおよびRNAの抽出

生物材料から核酸を抽出することは、多くの分子生物学的研究における重要な

第1段階をなす。抽出されたDNAまたはRNAは後述の酵素反応のための基質または鋳型として必要であり、従って生物学的に活性でなければならない。一般に細胞または組織からのDNAは、遺伝子のクローニングまたは同定のために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または制限酵素を用いる開窓による特異的配列の増幅に用いられる。遺伝子分析実験に後述使用するための細胞または組織からのゲノムDNAの精製は、一般にすべての細胞成分を放出させるための細胞溶解、次いで特異的分解酵素による蛋白質およびRNAの選択的消化を伴う。蛋白質物質その他の汚染物質から分離されたのち、DNA試料は比較的純粋であり、かつ機能的に活性である。分離工程は一般に有機溶剤による抽出、次いでアルコールによるDNAの沈殿によって行われる(サムブルック、フリッチュおよびマニアス(J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis), Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 第2版, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス, 1989)。汚染蛋白質をたとえば細胞溶解物のアルコール沈殿により特異的に除去することなく機能的に活性なDNAを調製する方法が記載されている(クス、ジュブニカルおよびルビンケリー(H. Xu, A. M. Jevnikar, E. Rubin-Kelly), Nucleic Acids Research 18, 4943)。従って重大な汚染物質は用いられる抽出剤、通常はディタージェント、であると認められる。従ってディタージェントを除去すればそのDNAは後述反応に使用するのに十分なものとなりうる。しかし一般にディタージェントの除去にはなお分離工程が必要であり、これに伴って調製時間が延長され、収率低下の可能性が増大する。従って分離工程を伴わない均質な系は、現在の方法に優る著しい利点をもつてあろう。

微生物ATPの抽出およびアッセイに関する現在の状況

迅速な微生物学的方法においては、ATPのホタルルシフェラーゼアッセイ法がしばしばバイオマス推定のために用いられる。細胞内ATP濃度はすべての細胞において類似しており、細胞当たりのATP量は細胞内容積にほぼ比例する。細胞は細胞当たりほぼ 10^{-13} モルのATPを含み、菌類は細胞当たりこれより

かなり多量のATPを含む。簡単な光学測定装置およびホタルルシフェラーゼ試薬を用いて、1ml容量中に 10^{-13} モルのATPを容易に検出する。これはほぼ 10^4 個の細菌細胞に相当する。生物検体中の細菌性ATPは、等容量の2.5%トリクロロ酢酸を添加することにより抽出する。しかしルシフェラーゼ反応に対するトリクロロ酢酸による妨害を避けるために、最終アッセイ容量1mlにおいて0.01mlを越える試料容量を用いることはできない。従って生物検体中における検出限界は細胞 10^4 個/mlである。酸を中和することによって状況は若干改善されるが、大部分の妨害はこの酸のカオトロピックアニオンにより起こる。

上記の状況により、代替となる抽出法が絶えず追及されてきた。代替抽出剤としては第四アンモニウム化合物、たとえば塩化ベンザルコニウムが示唆されている(アンゼン、ランディン、ニルソンおよびソア(S. Ansehn, A. Lundin, L. Nilsson, A. Thore), ATPの簡単なルシフェラーゼアッセイ法による細菌尿の検出, Proceedings: International Symposium on Analytical Application of Bioluminescence and Chemiluminescence, p. 438-445, ステート・プリンティング・アンド・パブリッシング社, カリフォルニア州ウェストレーク・ビレッジ, 1979)。しかし、第四アンモニウム化合物は抽出物をホタル試薬に添加したのちホタルルシフェラーゼを失活させて、発光を徐々にディケイ(decay)させる。このように発光に際してルシフェラーゼ活性が徐々にディケイするため、既知量のATPの添加によりアッセイを換算すること(国際的標準法)がほとんど不可能になる。上記の論文には、ウシ血清アルブミンの添加により失活作用に部分的に対抗しようと述べられている。しかし、のちにこの方法を最善のものにするための試みを行った際に、第四アンモニウム化合物によるルシフェラーゼの失活を完全に避けるのに必要な濃度のアルブミン(2.5-10%)はルシフェラーゼ反応の強い阻害をもたらすことが認められた(ランディン(A. Lundin) ATP, ADPおよびAMPの抽出および自動ルミノメトリーアッセイ, Analytical Application of Bioluminescence and Chemiluminescence, クリッカ、スタンレイ、ソルベおよびホワイト

ヘッド(L. Kricka, P. Stanley, G. Thorpe, T. Whitehead) 監修, pp. 545-552, アカデミック・プレス, ニューヨーク, 1984)。しかし重要な知見は、アルブミンはその目的にとって理想的ではなかったが、第四アンモニウム化合物によるルシフェラーゼ失活作用を中和することであった。第四アンモニウム化合物に対する他の中和剤はノニオン界面活性剤、たとえばツイーン20、ツイーン60、ツイーン80、ポリオキシエチレンエーテルW1およびトライトンX-100であることがのちに見出された(W. J. シンアンおよびJ. R. M. ハモンド, 欧州特許第309184号明細書)。S. コレーマインおよびV. タルカネンは抽出剤としてノニオン界面活性剤を使用することを独自に開示した(英国特許第1600424号明細書)。ノニオン界面活性剤は、ルシフェラーゼが第四アンモニウム化合物により徐々に失活するのに対抗し、かつそれら自体がルシフェラーゼ反応において強い阻害性を示すことがない。しかしノニオン界面活性剤の存在下で、第四アンモニウム化合物の添加に際してルシフェラーゼ反応のかんりの阻害が生じる(実施例1参照)。従って、第四アンモニウム化合物に関する両方の問題、すなわちルシフェラーゼの阻害および失活に対処する系は報告されていない。

ATPに適用した本発明の基礎となる考察

試料を實驗室へ輸送することは、迅速微生物学におけるATPのホタルアッセイ法の主要な利点、すなわち分析結果が数分で得られるという事実が排除される。このようなアッセイ法に対する主な市場は、実際には生化学的解析の困難がほとんど、または全く無い害による非實驗室条件下での現地試験である。このような条件下では、アッセイ法は普通は少数の試料を伴い、かつ周囲温度で保存された試薬ならびに低価格の簡単な計測器を用いて実施されなければならないであろう。分析操作は、単一アッセイ法に適した形式の試薬を用いて極めて簡単な最小数の工程を伴うべきであろう。ディップスティック手法に基づくこのようなアッセイ法のための原型の分析システムが報告されている(ランディン(A. Lundin), ルーティン微生物学におけるATPアッセイ法: 1980年代の現実に対する洞察から, ATP Luminescence: Rapid Methods in Microbiology, スタンレイ、

マッカーシーおよびスミサー(P. E. Stanley, B. J. McCarthy, R. Smither) 監修, 応用微生物学会テクニカルシリーズ26, ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズ, pp. 11-30, オックスフォード, 1989)。

ホタルアッセイ法に用いる市販試薬キットの開発に際しての重大な問題は、ホタルルシフェリン-ルシフェラーゼ試薬よりATP標準品の方が不安定なことである。ATPを周囲温度で長期間保存する方法を開発しようとは思えない。アッセイに際してATP標準品を再構成および分配することは、さらに問題を生じる。ATP標準液は、全アッセイ容量の正確に $\leq 1\%$ 容量で添加されなければならないであろう(ランディン(A. Lundin), ルミノメトリーによるATP監視の臨床応用, カロリンスカ・インスティテュートからの学位論文, 1990)。熟練していない者が現地試験条件下でマイクロリットル容量を正確にピペット分取することは、極めて実施困難であろう。自動装置の価格は、この市場では購入し難いものである。以上の問題をすべて解決し得たとしても、内部基準手法は2回の光学測定、すなわちATP標準の添加前および添加後の測定を必要とする。従っていくつかの観点からみて、ATP標準品を用いずにアッセイを実施し得れば極めて有利であろう。これは、すべての試料においてATP濃度に対し常に同じ関係をもつ本質的な安定な発光を伴う標準化されたホタル試薬を用いることにより達成するであろう。活性の損失なしに数年間保存しうる、数分間本質的に安定な発光を生じる凍結乾燥したホタル試薬が1970年代後期以来、市販されている(ランディン(A. Lundin), ルミノメトリーによるATP監視の臨床応用, カロリンスカ・インスティテュートからの学位論文, 1990)。測定機器の光応答の簡単な自動検量システムも十分に確立された技術である。残された唯一の問題は、発光に際して生物材料抽出物の添加が失活(発光のディケイを生じる)または阻害(低下するが、安定な発光を生じる)によりルシフェラーゼ活性に影響を及ぼすことがないのを保証することである。

微生物細胞については、細胞壁を迅速に透過して細胞内酵素を失活させる極めて有効な抽出剤を用いなければならない。このような抽出剤による酵素分析の防

害は下記により排除しうる：1) 抽出物の希釈（アッセイ感度を低下させる）。2) 抽出物から抽出剤を除去する（時間がかかり、労力を要する操作となる可能性が最も高い）。3) アッセイ緩衝液に中和剤を含有させることにより抽出剤を中和する。最後の示唆が明らかに最も関心のある代替法である。極めて有効な抽出剤に対する必要条件が、同様にその達成を困難にする。中和剤が比較的不活性であり、ルシフェラーゼ活性に影響を及ぼすべきではないという事実によってこの状況が簡単になることはない。

この観点における本発明の目的は、ルシフェラーゼの失活またはルシフェラーゼ反応の阻害をいずれも生じない抽出剤と中和剤の組み合わせの開発であると述べる事ができる。これらの目標を両方とも達成することによって初めて、現地試験条件下で、すなわちATP標準品を用いずに、簡便かつ信頼性のあるATPアッセイを実施することが可能である。

抽出剤の中和は、抽出剤を分解する化学反応の実施により達成しうる。最も簡単な例は酸性抽出剤を塩基の添加により中和することである。しかし正確なpH調整が必要であり（強い緩衝剤は阻害を生じる）、多くの状況において実施不可能であろう。さらに、最良の酸性抽出剤はカオトロピックアニオンを含み、これらは中性pHにおいて強い阻害を生じる。イオン強度の増大でルシフェラーゼ活性を低下させる。別法は化学反応によって新たな非阻害性化合物を形成することにより抽出剤を分解することである。しかしこれは酵素を阻害し、または失活させる可能性のある、反応性の高い反応体を用いなければならない可能性が最も高い。

最も関心がもたれる方法は、抽出剤分子と中和剤分子の間でコンプレックスを形成することである。第四アンモニウム化合物（1種のカチオン界面活性剤）を中和するためにノニオン界面活性剤を用いることはこの方法の一例である（W. J. シンブソンおよびJ. R. M. ハモンド、欧州特許出願第88308677.9号明細書）。実施例1に示すように、実際にノニオン界面活性剤はあらゆる種類のイオン性界面活性剤（カチオン、アニオンおよびツブタイオン）がホタルルシフェラーゼに及ぼす失活作用を中和する。しかしノニオン界面活性剤の存

在下ではすべてのイオン性界面活性剤が、失活を生じるものよりはるかに低い濃度において阻害作用を及ぼす。これはノニオン界面活性剤とイオン性界面活性剤との結合が低いこと、またはそれら2種類の界面活性剤間のコンプレックスによる阻害に起因すると思われる。説明に關係なく、この阻害はイオン性界面活性剤型の抽出剤が結合しうる生物材料の水相に於いて試料毎に異なる可能性がある。従ってアッセイ毎にATP標準品を用いる必要があろう。中和剤としてのノニオン界面活性剤の他の欠点は、必ずしもすべての酵素がこれらの試薬に対してホタルルシフェラーゼと同様に低抵抗性ではないということである。

抽出剤を中和するための理想的な化合物は、抽出剤に対して高い結合定数をもつものである。理想的にはそれは、酵素を失活させる抽出剤分子部分が含まれる層により囲まれた包埋コンプレックス（inclusion complex）を形成するであろう。明らかに中和用化合物は酵素に対して可能な限り不活性でなければならず、かつ分析的に重要な細胞内代謝物と不可逆的に結合すべきでない。ある種の界面活性剤、たとえば第四アンモニウム化合物は有用な抽出剤であることが認められている（ランディン（A. Lundin）、ATP、ADPおよびAMPの抽出および自動ルミノメトリーアッセイ、Analytical Application of Bioluminescence and Chemiluminescence、クリッカ、スタンレイ、ソルベおよびホワイトヘッド（L. Kricks, P. Stanley, G. Thorpe, T. Whitehead）監修、pp. 545-552、アカデミック・プレス、ニューヨーク、1984）。すべての界面活性剤分子に共通の特色は、親水性のテイルである。親水性外殻を有するコンプレックス中に疎水性テイルが埋め込まれた包埋コンプレックスの形成が理想的であろう。これはミセルを形成する中和剤により達成される可能性がある。しかし分析操作に際して添加された酵素がミセルに取り込まれて、活性の低下を生じる場合がある。さらに、酵素とミセル内における抽出剤との相互作用を排除することはできない。界面活性剤に対する理想的な中和剤は、酵素に結合する可能性のない親水性外殻、および界面活性剤と包埋コンプレックスを形成するのに適した大きさの疎水性の中空部を有する水溶性化合物であろう。

サイクロデキストリンの特性

サイクロデキストリンは6、7または8個のグルコース単位（ α 、 β および γ -サイクロデキストリン）からなるドーナツ形の分子である。環の内径はそれぞれ6Å、7.5Åおよび9.5Åである。環の内側は界面活性剤などの分子の疎水性テイルに結合する。生じる包埋コンプレックスは一般に界面活性剤とサイクロデキストリン間で1:1の化学量論的比において形成される。 α 、 β および γ -サイクロデキストリンとの結合定数は、界面活性剤の疎水性テイルの大きさおよび化学的特性に依存する。界面活性剤との結合定数は一般に 10^3 – 10^4 dm³ mol⁻¹であるが、 5×10^4 dm³ mol⁻¹のように高くてもよい（I. サタケ、T. イケノウエ、T. タケシタ、K. ハヤカワおよびT. マエダ、 α -サイクロデキストリンとイオン性界面活性剤およびそれらの同族体の結合の電導度分析および電位差測定による研究、Bull. Chem. Soc. Jpn. 58, 2746–2750, 1985; パレプおよびリカードソン（R. Palepu, J. E. Rickardson）、導電率測定による β -サイクロデキストリン/界面活性剤包埋化合物の結合定数、Langmuir 5, 218–221, 1989; I. サタケ、S. ヨシダ、K. ハヤカワ、T. マエダおよびY. クスモト、 β -サイクロデキストリンと両親媒性イオンの結合定数の電導度分析による測定、Bull. Chem. Soc. Jpn. 59, 3991–3993, 1986; T. オークボ、Y. マエダおよびH. キタノ、コングタンス停止フロー法により研究したイオン性界面活性剤とサイクロデキストリンの包埋プロセス、J. Phys. Chem. 93, 3721–3723, 1989; パレプおよびラインスボロー（R. Palepu, V. C. Reinsborough）、コングタンス測定による界面活性剤-サイクロデキストリン相互作用、Can. J. Chem. 66, 325–328, 1988）。サイクロデキストリンの外殻は親水性であり、大部分の酵素と相互作用しないと思われる。さらにサイクロデキストリンは水溶性であるが、たとえば重合により、または固体もしくは粒子の表面に付着させることによりそれらを固定化することができる。表面または溶液から界面活性剤を除去するためにサイクロデキストリンを使用す

ることにつき報告されている（P. カナおよびR. ドボルジャック、欧州特許出願第301,847号明細書）。この特許出願によれば、界面活性剤を溶液から固定化サイクロデキストリンにより除去することができる。除去するのではなく、包埋コンプレックスの形成により界面活性剤の作用を中和する可能性は評価されていない。P. カナらの欧州特許第286367号明細書には、アッセイ前にペプチドフラグメントの安定剤として用いられた界面活性剤を中和するためにサイクロデキストリンを使用することが記載されている。ある細胞には診断におけるサイクロデキストリンの種々の用途が記載されている（ゼトリ（J. Seelitz）、診断におけるサイクロデキストリン、Kontakle（ダムシュタット）1988（1）、31–36）。細胞内代謝物を放出させるために抽出剤として添加された界面活性剤を中和するためにサイクロデキストリンを使用することは、これまで記載がない。

発明の記述

本発明によれば、細胞内成分および細胞成分を抽出するために用いた物質を含有する溶液を供給することにより細胞内成分の抽出物を調製する方法において、該溶液を、抽出用物質を中和するために適切な種類および適切な量のサイクロデキストリンまたはサイクロデキストリン誘導体と接触させることを特徴とする方法が提供される。細胞内成分の性質は本発明の構成要素ではない。一例は核膜、たとえばDNAおよびRNA、ならびにATPを含めた他の前記の細胞内代謝物である。

本明細書で用いる“中和する”という語は、pHを7.0に調整することを意味するものではない。むしろ抽出剤の中和は、そうしなければ抽出された細胞内成分の破壊処理において抽出剤が引き起こすであろう妨害の減少/排除/克服をもたらすものである。

サイクロデキストリンまたは誘導体の機能は、抽出用物質または抽出剤を中和することである。前記のように、これは原理的には抽出剤の分解により行うことができる。サイクロデキストリンまたは誘導体を不溶性の形で用いる場合、抽出剤と共に形成されたコンプレックスも不溶性であり、残りの溶液から容易に物理

的に除去される。より一般的には、サイクロデキストリンまたは誘導体は溶液状態で用いられ、抽出剤とのコンプレックスを形成することによりそれを中和する。次いでそのコンプレックスを溶液から除去することができるが、通常はそれは不必要であるか、または望ましくはない。界面活性剤を完全に中和することが好ましいが、本発明は部分中和を生じる条件をも考慮する；これらは後述のアッセイ、増幅または検出操作のいずれにおいても、抽出剤による妨害を有意に減少させるものでなければならない。

他の観点においては、本発明はここに記載する方法による生物検体中のATPの抽出およびアッセイのためのキットにおいて、下記の構成成分：

- a) 抽出用物質（他の成分と分離して保存する）、
 - b) サイクロデキストリン、
 - c) ホタルルシフェラーゼ試薬
 - d) アッセイ緩衝液
- を含むことを特徴とするキットを提供する。

好ましくは、抽出用物質は流体検体と接触した際に適切なサイズの試料を捕獲するキャリアーの上または中において乾燥されており；サイクロデキストリンはアッセイ緩衝液に溶解されており；ホタルルシフェラーゼ試薬はアッセイ緩衝液中へ試薬を放出するキャリアーの上または中において乾燥されている。

抽出剤とサイクロデキストリンの結合が分析操作に用いられる酵素の阻害または失活を避けるのに十分なほど強固である限り、いかなる種類の抽出剤およびいかなる種類のサイクロデキストリンまたはサイクロデキストリン誘導体も使用しうる。抽出剤は好ましくは界面活性剤であり、これをいずれのサイクロデキストリンがその界面活性剤を最も効果的に結合させるかに応じて α 、 β または γ -サイクロデキストリンと接触させることが好ましい。カチオン、アニオンおよびツビッターイオン界面活性剤をサイクロデキストリンにより中和することができ（実施例1）。いずれのサイクロデキストリンがその界面活性剤に最適である可能性があるかという概念は、公表されている結合定数からしばしば得られる（前記の文献を参照されたい）。個々の用途につき最適な抽出剤およびサイクロ

デキストリンの種類および濃度を定めることは、実施例の記載に従って実施しうる（後記を参照されたい）。サイクロデキストリンは、形成される包接コンプレックスの化学量論的量を考慮したモル量に基づいて、抽出剤より過剰に用いることが好ましい。サイクロデキストリンは抽出終了後の分析操作のいかなる工程においても、ただし常に、アッセイに關与する酵素の添加前またはそれと同時に添加することができる。

ATPのホタルアッセイ法における抽出剤の中和剤としてのサイクロデキストリンの主な利点は、発光が抽出剤／中和剤のコンプレックスによる阻害または失活によって影響されない分析条件を見出しうることである。これは、高い結合定数を有する抽出剤／サイクロデキストリンの組み合わせを用いて達成しうる。従来用いられている中和剤、たとえば第四アンモニウム化合物を中和するために用いられるノニオン界面活性剤（W. J. シンソングおよびJ. R. M. ハモンド、欧州特許第309184号明細書）を用いた場合、失活を避けることはできるが、阻害は避けられない。サイクロデキストリンは酵素を阻害または失活させる可能性がなく、酵素試薬の安定剤として実際に用いられている（ゼトリ（J. Seelitz, 診断におけるサイクロデキストリン, Kontakte (ダルムシュタット) 1988 (1), 31-36)。ルシフェラーゼ反応における発光に対して β -サイクロデキストリンによる見かけの阻害作用が認められた（実施例1）。しかしこの作用はD-ルシフェリン/ β -サイクロデキストリンのコンプレックス形成によるものであることが示された。この問題はD-ルシフェリンの濃度を高めることにより排除された。他のいずれかのアッセイにおいて見かけの阻害作用が認められた場合は、使用するサイクロデキストリンの存在下ですべての補助因子の濃度を最適なものにすることが推奨される。

本発明に基づいて抽出剤、サイクロデキストリンおよびホタル試薬を種々のタイプの微生物または特殊なタイプの試料中の細胞内ATPの抽出およびアッセイのためのキット形式に組み合わせることは簡単なことである。現地用として選した分析システムは、本発明を前記のチップスティック手法と組み合わせることにより開発しうる（ランディン（A. Lundin）、ルーティン微生物学にお

けるATPアッセイ法：1980年代の現実に対する洞察から、ATP Luminescence: Rapid Methods in Microbiology, スタンレイ、マッカーシーおよびスミサー（P. E. Stanley, B. J. McCarthy, R. Smith）監修、応用微生物学会テクニカルシリーズ26、ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズ、pp. 11-30、オックスフォード、1989）。これらのシステムにおいては、予め定められた容量の試料を抽出剤（たとえばマトリックス上において乾燥させた第四アンモニウム化合物）と接触させ、次いで抽出された試料、およびホタル試薬（同様にマトリックス上において乾燥させたもの）を、適切なサイクロデキストリンを含む予め分配された緩衝液に溶解する。抽出されたATP、サイクロデキストリンにより中和された抽出剤、ホタル試薬および緩衝液を含むキューベットの発光を、携帯用計測器により直接に測定することができる。検定された試薬および計測器を用いると、各アッセイを個々にATP標準品で検量する必要がないであろう。従ってピペットを使用しに1分以内で操作全体が完了するであろう。

以下においてホタルルシフェラーゼ法による微生物中の細胞内ATPの抽出およびアッセイの例によって、本発明をさらに説明する。微生物ATPの抽出に第四アンモニウム化合物を用いることは十分に確立されている（ランディン（A. Lundin）、ATP、ADPおよびAMPの抽出および自動ルミノメトリアッセイ、Analytical Application of Bioluminescence and Chemiluminescence, クリッカ、スタンレイ、ソルベおよびホワイトヘッド（L. Kricka, P. Stanley, G. Thorpe, T. Whitehead）監修、pp. 545-552、アカデミック・プレス、ニューヨーク、1984）。第四アンモニウム化合物はカチオン界面活性剤である。実施例において、アニオンおよびツビッターイオン界面活性剤も使用しうることを示されるであろう。サイクロデキストリンによる界面活性剤の中和を含めたホタルアッセイ法による微生物ATPの抽出法の開発に際して行った工程が実施例に示される。

実施例1

サイクロデキストリンによる特定の抽出剤の検定

従来の実験によりホタルルシフェラーゼを急速に失活させることが知られている各種の界面活性剤から有効な一連の抽出剤を選んだ。これらの抽出剤には下記のものが含まれていた：異化ドデシルトリメチルアンモニウム（DTAB；シグマ・ケミカル社；D8638）、塩化セチルピリジニウム（CPC；シグマ・ケミカル社；C9002）、塩化ベンザルコニウム（BAC；ACOLレーケメーデルAB；10%原液）、塩化ベンゼトニウム（BZC；アルドリッチ；B470-8）、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンサルホネート（DDAPS；シグマ・ケミカル社；D4516）、およびドデシル硫酸ナトリウム（SDS；シグマ・ケミカル社；L4509）。DTAB、CPC、BACおよびBZCは第四アンモニウム化合物に属するカチオン界面活性剤である。DDAPSはツビッターイオン界面活性剤であり、SDSはアニオン界面活性剤である。これらの界面活性剤を α 、 β または γ -サイクロデキストリン（ α CD、 β CDまたは γ CD；シグマ・ケミカル社；C4642、C4767またはC4892）またはツイーン80（ケガAB、スウェーデン、ストックホルム；1.7267）で中和した。

下記の溶液を調製した：

1. T/E緩衝液：2mmol/l EDTA（E. メルク、F. R. G.；8382）を含む、酢酸でpH7.5に調整された0.1mol/l トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（E. メルク、F. R. G.；8382）。
2. AMR：5mlの蒸留水中において再構成されたATP標準試薬（バイオオービット・オイ、ツルク、フィンランド）のバイアル1本。
3. ATP：10mlの蒸留水中において再構成されたATP標準品（バイオオービット・オイ、ツルク、フィンランド）のバイアル1本。
4. T/E緩衝液中における抽出剤の原液（SDSは1%w/v、他のすべての抽出剤は2%w/v）。
5. T/E緩衝液中における中和剤、すなわち α CD、 β CD、または γ CD

(2.5%w/v)またはツイーン80 (1.0%w/v)の原液(BCDは増解するために高濃度の水道水中で加温する必要がある)。

ホタル試薬(AMR)は、ルシフェラーゼ、D-ルシフェリン、ピロホスフェート、ウシ血清アルブミン、およびマグネシウムイオンを含有する。1.0 $\times 10^{-4}$ mol/lの濃度範囲でATP濃度に比例した本質的に安定な発光(ディケイ速度<2%/分)が得られる(ランディン(A. Lundin)、ルミノメトリによるATP監視の臨床応用、カロリンスカ・インスティテュートからの学位論文、1990)。測定は、3個のディスペンサー(AMR、ATPおよび抽出剤につきそれぞれ1個)、電位差記録計およびプリンターを備えた自動1251ルミノメーター(バイオオービット・オイ、ツルク、フィンランド)を用いて行われた。各実験の前に、0.0、0.1、0.2または0.3mlの中和剤(2.5% α CD、2.5% β CD、2.5% γ CDまたは1.0%ツイーン80)および最高0.9mlのT/B緩衝液を収容した一連のキューベット最高25個をルミノメーターに装填した。特別にデザインされたプログラム(本発明者から入手しうる)を用いて、ルミノメーターにより下記の工程を実施した:

1. 混合下に0.1mlのAMRを添加。
2. 混合下に0.01mlのATP(キューベット中の最終濃度 10^{-4} mol/l)を添加。
3. 最後の添加の5秒、20秒および35秒後に発光を測定。
4. 0.01mlの抽出剤を添加。
5. 工程3および4の反復(10回)。

この測定実験の結果を図1に示す。最初の8回のDTABの添加は、0.5% α CDの存在下で発光に及ぼす影響はごくわずかである。9回目以降の添加はルシフェラーゼの阻害(発光の不連続的低下)および失活(発光のディケイ速度の増大)を及ぼす。DTABおよびツイーン80を用いた場合、明瞭な阻害が1回目の添加時に既に認められ、失活は3回目または4回目の添加後に認められる。BZCの最初の7回の添加は、0.5% β CDの存在下で阻害も失活も生じない(発光のわずかな増大についてはのちに説明する)。8回目の添加後に発光が低

下する。ツイーン80の存在下では、1回目のBZC添加が既に阻害を及ぼすが、失活は8回目の添加後に初めて有意となる。

上記の操作により10回の抽出剤添加後に発光に対する影響の測定が可能となった。各添加後に、一次反応が検定される20および35秒の時点での測定から発光のディケイ速度を計算した。速度定数および20秒発光値を用いて、抽出剤添加時(0秒)の発光を外挿した。これらの外挿した発光値から、抽出剤添加前の発光値で割ることにより、各抽出剤添加後に残留する発光のフラクションを計算した(35秒値)。各抽出剤添加についてのこれらのフラクション値を掛けることにより、阻害の影響を受けているけれども経時的な失活の影響を受けていない一連の相対発光値が得られた。最後に相対発光およびディケイ速度 γ の中和剤の種類および濃度において抽出剤濃度に対してプロットした(0.25、0.50および0.75%の α CD、 β CDおよび γ CD、ならびに1、2および3%のツイーン80)。結果を図2-7に示す。中和剤を用いない結果をも示す。ただしウシ血清アルブミン(0.1%w/v、キューベット中)は部分中和剤であることを考慮すべきである。抽出剤濃度(キューベット中の%)、抽出剤の添加により生じるわずかな希釈については補正しない)をx-軸に示す。 γ -軸は相対発光(100%から開始)およびディケイ速度(0%/分から開始)を示す。

DTABについての結果を図2に示す。 α CDおよび β CDを用いた場合、ディケイ速度は一定の抽出剤水準に達するまで本質的にゼロであり、その後急激にディケイ速度が増大する。 γ CDおよびツイーン80を用いた場合、ディケイ速度は低いDTAB水準から既に増大する。 α CDを用いた場合、相対発光は抽出剤濃度が失活を生じる水準に達するまで100%付近に留まり、その後低下し始める。 β CDを用いた場合、相対発光は抽出剤濃度が失活を生じる水準に達するまで抽出剤濃度と共にわずかに増大し、その後低下し始める。 γ CDおよびツイーン80を用いた場合、相対発光は抽出剤濃度と共に低下する。CPC、BACおよびDDAPSについても同様な結果が得られた(図3、4および6)。

BZCについての結果を図5に示す(中和は図2の場合と同様であったが、ただし最高濃度の中和剤を除外した)。 α CDを用いた場合、得られた中和効果は

ごくわずかであった。 β CDおよび γ CDを用いた場合、一定の抽出剤水準に達するまでディケイ速度は本質的にゼロであり、相対発光は100%に近く、その後急激にディケイ速度が増大し、続いて相対発光が急激に低下した。ツイーン80を用いた場合、相対発光の不連続的低下を伴ってディケイ速度が連続的に増大した。

SDSについての結果を図7に示す(γ CDは除外した)。 α CDを用いた場合、ディケイ速度は一定の抽出剤濃度に達するまで本質的にゼロであった。相対発光はディケイ速度が低下し始める少し前に低下し始めた。 β CDおよびツイーン80を用いた場合、ディケイ速度は抽出剤濃度と共に連続的に増大し、ただしかなり高い濃度まで低い状態に留まった。相対発光強度は最低の抽出剤濃度から徐々に低下した。

0.25、0.50および0.75%のサイクロデキストリンにおいてディケイ速度を抽出剤濃度の関数として示す曲線は類似していたが、サイクロデキストリン濃度が高いほど高い抽出剤濃度の方へ変位した。これは明らかに抽出剤とサイクロデキストリンのコンプレックスの形成による滴定効果を反映する。曲線間の変位はディケイ速度100%/分において、ある程度任意に測定された。変位は抽出剤のモル数として表され、変位を生じたサイクロデキストリンのモル数で割られた。ディケイ速度が一定の抽出剤水準までゼロに近く、次いで急激に増大する場合、これは包埋コンプレックスにおける抽出剤とサイクロデキストリンのモル比のかなり正確な値を与えるであろう。遊離の形の抽出剤フラクションを生じる低い結合定数の包埋コンプレックス、またはそれ自体がルシフェラーゼを失活させる抽出剤-サイクロデキストリンコンプレックスは、より不明瞭な滴定効果を与えるであろう。これはコンプレックスにおけるモル比につきわずかな推定を与えるにすぎない。 α CDについてはこのモル比は0.90(DTAB)、0.48(CPC)、0.71(BAC)、0.89(DDAPS)および1.07(SDS)であった。 β CDについてはこのモル比は0.86(DTAB)、0.45(CPC)、0.74(BAC)、0.85(BZC)、0.93(DDAPS)および1.25(SDS)であった。 γ CDについてはこのモル比は0.

87(BZC)および0.89(DDAPS)であった。BACは数種の分子の混合物であり、分子量は最も主要な分子種 $C_{12}H_{19}NO_6$ 、 $C_{14}H_{21}NO_6$ から推定しなければならなかった。従って結果はCPC以外のすべてのディタージェントにつき1:1の化学量論的比に匹敵するものであった。CPC分子は芳香環構造および長い脂肪族炭化水素テイルを有する。従って2個のサイクロデキストリン分子に結合し、その結果モル比0.50となる可能性がある。この研究に用いた大部分の抽出剤につき1:1の化学量論的比が主張されている(前記の文献を参照されたい)。

中和剤の重要な観点は、それ自身が抽出剤の存在下で発光に及ぼす影響である。図8は発光がツイーン80により影響されたとしてもわずかにあり、一方サイクロデキストリンは濃度が増大した場合にわずかな阻害を生じたことを示す。阻害は β CDを用いた場合に最強であった。この阻害はサイクロデキストリンがD-ルシフェリンと包埋コンプレックスを形成することによるものであり、 β CDにつき結合定数が最高であると思われる。これは β CDおよび高い濃度の大部分の抽出剤(DTAB、CPC、BACおよびDDAPS)を用いた場合に生じる高い活性を説明するものであろう。この説明によれば、ある程度高い濃度のD-ルシフェリンを用いることによって高い活性を失わせることができるであろう。この仮説は図9-10に示した実験において確認された。0.25mg/lのルシフェラーゼ(エンザイマティックス社、英国ケンブリッジ)、種々の濃度のD-ルシフェリン(バイオテマAB、スウェーデン、ダラロ)、5mmol/lの酢酸マグネシウム、0.001mmol/lのピロリン酸四ナトリウム(シグマ・ケミカル・カンパニー、米国ミズーリ州;T6379)および0.1%ウシ血清アルブミン(A4503、シグマ・ケミカル・カンパニー、米国ミズーリ州)を含有するホタル試薬を、0.75% β CDを含有する、および含有しないT/B緩衝液中において調製した。10 \times mol/lのATPを添加したのち、1250ルミノメーター(バイオオービット・オイ、フィンランド、ツルク)により本質的に安定な発光を測定した。予備実験(示されていない)において、 β CDの存在下での最適D-ルシフェリン濃度は0.2g/lであることが見出された。

図9はβCDの不在下でD-ルシフェリン濃度を増大させると発光が低下したことを示す(高阻害)。βCDの存在下ではD-ルシフェリンが0.2から0.4g/lになると発光が著しく増大し、0.4から0.8g/lになるとわずかに増大し、0.6から0.8g/lになるとわずかに低下した。最適D-ルシフェリン濃度がβCDの不在下での0.2g/lから0.75%βCDの存在下での0.6g/lに移行したことは、βCDがD-ルシフェリンと包埋コンプレックスを形成することを強く示すものである。

βCDを含有しないホタル試薬に1.0μl容量の5%DTABを1回添加すると、ルシフェラーゼの失活のため発光が急激にディケイした(示されていない)。0.75%(6.6mmol/l)βCDの存在下で、キューベット中0.2%(6.6mmol/l)に相当するDTABの4回目の添加時に、発光の緩やかなディケイが認められた。DTAB添加後の種々の水準のD-ルシフェリンを含有する試薬からの発光強度を図10に示す。測定はDTABを添加したのち直ちに行われたので、DTABによるルシフェラーゼの経時的失活により影響されなかった。最適より著しく低いD-ルシフェリン水準(0.2g/lまたは0.7mmol/l)において、DTABの添加は相対発光を増大させた。最適よりわずかに低い(0.4g/l)D-ルシフェリン水準において、DTABの添加が発光に与えた影響はごくわずかであった。最適(0.6g/l)およびより高い(0.8g/l)D-ルシフェリンにおいては、DTABの添加は発光を低下させた。これらの影響についての最も可能性のある説明は、βCDに対してDTABがD-ルシフェリンと比較してより高い親和性を有するというものである。従ってDTABの添加はD-ルシフェリンをβCDコンプレックスから解放し、その結果、最適より著しく低いD-ルシフェリン水準においては発光が増大し、最適よりわずかに低いD-ルシフェリン水準においては発光が本質的に変化せず、最適またはより高いD-ルシフェリンにおいては発光が低下した。

図2-7に示した結果を表1にまとめる。この表は6実験すべてにつき≥5%の阻害または≥2%/分のディケイ速度を生じる最低濃度(最終アッセイ混合物中における%として表す)を示す。これらの実験において抽出剤は、各段階が0.1%

0.1%であったSDS以外は0.02%ずつ段階的に添加された。濃度の後の文字“d”はディケイ速度が≥2%/分であったことを意味する。文字“i”は阻害が≥5%であったことを意味する。許容し得ない阻害およびディケイ速度についてのカットオフ限界は、ある程度任意に定められると思われる。それらが実際に意味するものは、試料と試薬の混合の間で2.5分の過剰期間に全5%の阻害および全2%/分のディケイ速度を与える試料は10%低すぎるATP値を与えるであろうということである。この水準における影響は、厳密に制御された分析操作を用いることにより数率的に補正しうるのである。

表1: 各種中和剤の存在下で阻害≥5%またはディケイ速度≥2%/分を生じる最低抽出剤濃度

中和剤	濃度 (%)	DTAB	CPC	BAC	DDAPS	SDS
なし		0.02 d	0.02 d ¹	0.02 d	0.02 d	0.02 i
αCD	0.25	0.10 d ¹	0.06 d ¹	0.06 d ¹	0.02 d	0.02 i ¹
	0.50	0.16 d ¹	0.08 i ¹	0.10 d ¹	0.02 d	0.04 i ¹
	0.75	0.20 d ¹	0.12 i ¹	0.16 d ¹	0.02 d	0.06 i ¹
βCD	0.25	0.08 d	0.02 d	0.04 d	0.10 d	0.03 i
	0.50	0.14 d	0.04 d	0.06 d	0.10 d	0.03 i
	0.75	0.18 d	0.06 d	0.10 d	0.04 d	0.03 i
γCD	0.25	0.04 d	0.02 d	0.02 d ¹	0.02 d	0.02 d
	0.50	0.04 d	0.02 d	0.02 d	0.02 d	0.02 d
	0.75	0.04 d	0.02 d	0.02 d	0.02 d	0.02 d
ツイーン 80	1.00	0.04 d	0.04 i	0.04 i	0.04 i	0.01 i
	2.00	0.04 i	0.04 i	0.04 i	0.04 i	0.01 i
	3.00	0.04 i	0.04 i	0.04 i	0.04 i	0.01 i

¹ 濃度の後の文字“d”はディケイ速度が≥2%/分であったことを意味する。文字“i”は阻害が≥5%であったことを意味する。濃度の後の記号“*”はディタージェント/サイクロデキストリンのモル比を計算したうちで最良のディタージェントとサイクロデキストリンの組み合わせを示す(後記を参照)。

表1にまとめた実験においては、抽出剤は各段階が0.01%であったSDS以外は0.02%ずつ段階的な濃度増大を生じるように添加された。従って試薬中の濃度から0.02%(SDSについては0.01%)を差し引いたものが分析上の妨害を与えない許容しうる濃度を与える。これらの結果は下記のとおり記述しう:

- 1) 中和剤が無い場合、実験に含まれる抽出剤の許容濃度は≤0.02%であり、これより高い濃度における主要な問題はディケイ速度であった。
- 2) βCDの方が良好であったBZC以外は、αCDがすべての抽出剤につき最良の中和剤であった。サイクロデキストリン濃度を0.25-0.75%の範囲で増大させることにより状況が改善された。SDS以外は阻害よりむしろディケイ速度がサイクロデキストリンを用いる場合の制限因子であった。
- 3) αCDを用いた場合の許容しうるディタージェント濃度についての平均モル比は下記のとおり計算しうる: DTABについては0.88、CPCについては0.37、BACについては0.48、DDAPSについては0.93、SDSについては0.19。βCDを用いた場合の対応するBZCについての比は0.73であった。SDSについてはこのモル比は化学量論的値から予想されるものよりかなり低い。SDSとαCDの比を≤0.19に維持しない限り、すべての抽出剤を包埋コンプレックスとして中和した状態に維持するためには結合定数が低すぎると思われる。
- 4) ツイーン80を用いた場合、許容濃度は一般に0.02%(DDAPSについては0.04%、SDSについては<0.01%)であり、主要な問題は阻害であった。ツイーン80濃度を1-3%の範囲で増大させることによって状況は改善されなかった。

サイクロデキストリンはツイーン80と比較して、界面活性剤型の抽出剤(カチオン、アニオン、ツビターイオン)に対するより良好な中和剤であり、より高濃度の抽出剤の使用が可能になると結論される(アッセイ前の抽出物の希釈はより低いことが必要である)。大部分の抽出剤につきαCDが最良の中和剤である。しかしBZCのように界面活性剤分子の疎水性テイルが高すぎる場合はβ

CD(またはよりいっそう漸進的なテイルについてはγCD)の方が良好である。明確な測定曲線を示すサイクロデキストリン(高い結合定数を有する包埋コンプレックスの形成を示す)については、抽出剤の許容濃度は本質的にサイクロデキストリン濃度に比例する。従って最終アッセイ混合物中の抽出剤の予想水準にサイクロデキストリンの量を調整しうる。βCDの存在下である種のディタージェントにつき見られた発光制約は、抽出剤添加時にβCDから放出されるD-ルシフェリンの量を考慮して常に最適D-ルシフェリン濃度でアッセイを実施することにより排除しうる。αCDおよびγCDも若干の発光阻害を示すので、それらについても同様な、ただしはるかに低い影響が見られるであろう(図8)。その場合も改善策はβCDと同じ、すなわち若干高い濃度のD-ルシフェリンを用いることである。

実験例2

最適な抽出剤の種類および濃度の決定

特定の種類の細胞からのATPの抽出は、主として抽出剤の種類および濃度、細胞の種類、ならびに全体的な試料組成により影響される。細胞数、細胞の生理的状態(増殖の位相など)、ならびに増殖速度の相異なる副次的な影響を予想すべきである。高い膜透過性は膜による抽出に影響を及ぼし、高い水準の蛋白質または脂質は界面活性剤による抽出に影響を及ぼすであろう。従って特定の種類の試料における特定の種類の細胞のいずれについても、最適な抽出条件を見出す必要がある。数種類の抽出剤に関し、各種類につき数種類の濃度を用いて得たATP収率を比較することが、実際の細胞内ATP濃度を反映する最適抽出条件を見出す唯一の方法である。これまでの研究(ランディン(A. Lundin), ATP, ADPおよびAMPの抽出および自動ルミノメトリアッセイ, Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence, クリンカ, スタンレイ, トルベおよびホワイトヘッド(L. Krinka, P. Stanley, G. Thorpe, T. Whitehead) 監修, pp. 545-552, アカデミック・プレス, ニューヨーク, 1984)から、大部分の状況において最大ATP収率は10、5および2.5%トリクロロ酢酸(TCA)を用いた収

率と比較することにより判定しうることが知られている。従って各種抽出剤の比較には常に対照法としてTCAを含めるべきである。最終的な抽出剤の種類および濃度は、試料のわずかな変化がATP収率に影響を及ぼさないように選ぶべきである。抽出剤が最適濃度においてすなわち他の抽出剤より有意に低い場合は、これはその収率が変動性であり、わずかに変化した条件下ですら（たとえば他の増殖相）かなり低いことを示す。抽出を妨害する試料成分の濃度のわずかな増大がこれらの試料中のATP収率を低下させるのを避けるために、抽出剤濃度は最適濃度範囲内で可能な限り高く選ぶべきである。

数種類の微生物を含む試料につき、各種抽出剤の最適濃度および濃度を見出すために実験を行った。抽出剤は第四アンモニウム型のカチオン界面活性剤（DTABおよびBZC）、ツビターイオン型界面活性剤（DDAPS）、およびアニオン界面活性剤（SDS）であった。TCAは対照法として含めた。微生物には細菌（緑膿菌（*P. aeruginosa*）、大腸菌（*E. coli*）および枯草菌（*B. subtilis*）、酵母（ビール酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、および菌類（クロレラ・ブルガリス（*Chlorella vulgaris*））が含まれる。細菌は概して30℃で一夜、ルリア（Luria）ブロス（5g/l NaCl、10g/lトリプトン、および5g/l酵母エキス）中において増殖させた。酵母は概して37℃で一夜、ルリアブロス中において増殖させた。クロレラは既知培養物として、藻類および原生動物のタイプカルチャーコレクション（フレッシュウォーター・バイオロジカル・アソシエーション、英国LA22 OLPカンブリア、アンブレサイド、ザ・フェリー・ハウス）から得られた。クロレラ以外の培養物はすべてアナラル水（Analar water）中に10倍希釈された。下記を含有する抽出剤の2倍希釈液を調製した：10、5、2、5、1、25、0、625、0、3125、0、15625、0、078125、0、0390625、0、01953125および0、009765625%の抽出剤、5mmol/lのEDTA中。等容量（0、1ml）の抽出剤および希釈試料を混合した。1および30分後、2%ツイーン80を含有するT/E緩衝液0、8mlを入れた2

系列の平行したキューベットに、得られた抽出物50μlアリコートをした。ツイーン80は抽出剤の界面活性作用を中和する。しかし抽出されたATPは、ATPを伴う酵素反応に必要なEDTA-ATP複合体形成性2価金属イオンの存在下では希釈後に本質的に安定であると予想される。高濃度の抽出剤においては抽出は数秒以内に完了するが、低濃度では抽出はこれよりかなり長期間を要し、低い収率を与える。高濃度の抽出剤における第1および第2系列からの結果を比較すると、抽出物中におけるATPの安定性が推定される。この実験においては、サイクロデキストリンではなくツイーン80を用いた。各アッセイにおいてATP標準品を添加して自動1251ルミノメーターにより、高度に希釈した試料を用いてアッセイを実施しうるのである。キューベットをルミノメーターに装着し、以下のアッセイ操作を自動的に行った：

- 1) 温度を25℃に平衡化（10分）。
- 2) 0、1ml AMRの添加。
- 3) 20秒遅れて発光、I...、を測定。
- 4) 0、01ml ATPの添加。
- 5) 20秒遅れて発光、I...、を測定。

これらの遅れは安定な発光を確保するために採用された。キューベット中のATP濃度、C...、を次式により計算した：

$$C_{ATP} = \frac{C_{ATP} \cdot I_{ATP}}{I_{ATP} - I_{ATP}}$$

確実に細胞内ATPのみを測定するために、希釈物およびブランクにつき適宜な補正を行った（細胞内ATPのみを与える抽出剤はない）。結果を図11-15に示す。

緑膿菌（図11）および大腸菌（図12）については、最適濃度のDTAB、BZCおよびTCAにつき類似のATP収率が得られた。ツビターイオン界面活性剤（DDAPS）もアニオン界面活性剤（SDS）も使用できないであろう。枯草菌（図13）、ビール酵母（図14）、およびクロレラ・ブルガリス（図1

5）については、最適濃度の5種類の抽出剤すべてにつき類似の収率が得られた。図11-15のデータからは、いずれの微生物についても好ましい抽出剤についての決定を行うことはできない。そのような決定には、たとえば異なる増殖位相の細胞についての研究を含めた、より複雑な実験が要求されるであろう。さらに、実際の試料において細胞を他の媒質に懸濁した場合、その媒質中において抽出を行う必要がある。実際の試料が数種類の微生物系統を含む場合、それらすべての系統につき研究を行う必要がある。しかし図11-15のデータは、抽出剤および各抽出剤につき従って実験に使用すべき濃度範囲を選択するために利用しう。このような選択および若干の予備実験を特定の用途につき実施例3に示す。

実施例3

微生物ATPのアッセイ法における抽出剤中和のためのサイクロデキストリンの使用

プロセス水中のバイオマス推定のためにATPのホタルアッセイ法を採用しう。プロセス水中の微生物には、種々の細菌、酵母および藻類の系統が含まれるであろう。モデル実験において、共にルリアブロス中における尋常変形菌（*Pr. vulgaris*）、枯草菌、エーロモナス・ヒドロフィラ（*Aeromonas hydrophila*）、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）、緑膿菌およびビール酵母の一夜培養物をアナラル水に10倍希釈した。ブロスからの有機物質は界面活性剤を用いる抽出をある程度妨害する可能性がある。プロセス水も若干の有機物質を含有する可能性があるが、大部分は10倍希釈ブロスより低い水準であると思われる。従ってモデル実験において有効な抽出法は実際の試料においても有効であると思われる。希釈されていない藻類培養物（ミドリムシ（*Euglena gracilis*）、クロレラ・ブルガリスおよびアナバ・シリンドリカ（*Anabaena cylindrica*）、フレッシュウォーター・バイオロジカル・アソシエーションから入手）および実際のプロセス水試料についても同様に実験を行った。

実施例2のデータによれば、すべての種類の微生物細胞（細菌、酵母および藻類）に使用しうる3種類の抽出剤はDTAB、BZCおよびTCAであった。こ

れらの抽出剤それぞれにつき、5mmol/lのEDTAを含有するアナラル水中の10、5および2、5%溶液を調製した。等容量の抽出剤溶液を入れたキューベットに試料（50μl）を添加し、次いでT/E緩衝液0、8mlを添加した。DTABを含有する抽出物については緩衝液は重量基準で5倍多いαCDをも含み、BZCを含有する抽出物については緩衝液は4倍多いβCDを含有していた。その結果、モル比0、63（DTAB/αCD）および0、61（BZC/βCD）、すなわち実施例1において計算した最高許容比（それぞれ0、88および0、73）より十分に低いものとなった。ATPのアッセイは実施例2の場合と同様に1251ルミノメーターにより自動的に実施された。測定に際して第四アンモニウム化合物により発光のディレイをもたらすシフェラーゼ失活は生じなかった。これは、本発明の原理が実際の微生物ATPアッセイにおいて確かに有効であることの重要な確認であった。

図16-18は上記9種類の微生物（尋常変形菌、枯草菌、エーロモナス・ヒドロフィラ、蛍光菌、緑膿菌、ビール酵母、ミドリムシ、クロレラ・ブルガリスおよびアナバ・シリンドリカ）を用いたモデル実験で得た代表的結果を示す。2種類の最低TCA濃度（有効濃度1、25および2、5%）は、少なくとも4種類の微生物（枯草菌、緑膿菌、ビール酵母およびクロレラ・ブルガリス）については不適当であった。最高TCA濃度（有効濃度5%）は、6種類の微生物（枯草菌、エーロモナス・ヒドロフィラおよびクロレラ・ブルガリス以外のすべて）において最高または最高に近いATP収率を与えた。しかしこの濃度は発光に害しい阻害を生じ、このためより低い濃度を与え、あらゆるアッセイにおいて内部ATP基準を用いることが必要となる。第四アンモニウム化合物（DTABおよびBZC）による抽出は、調べた範囲においては抽出剤濃度によりほとんど影響されなかった。最適濃度より2倍過剰が安全性限界として好ましいであろう。従って実験的証拠に基づいて、好ましい濃度は2、5%有効濃度とすべきであるが、これより低い濃度も同様に良好に作動するであろう。BZCは、4種類の微生物（エーロモナス・ヒドロフィラ、緑膿菌およびビール酵母）において最高または最高に近いATP収率を与えた。DTABは、7種類の微生物（蛍光菌およびア

ナベナ・シリンドリカ以外のすべて)において最高または最高に近いATP収率を与えた。

抽出法についての最終決定は、各用途の実際の試料を用いた実験に基づいてなされ、かつ可能な限り一般的であるように適定しなければならない。3種類のプロセス水についてのこのような結果を図19に示す。3種類すべての試料においてDTABを用いた場合に最良の結果が得られた。等容量の抽出剤溶液(0.01-3.5%DTAB)で抽出した他の3種類のプロセス水試料(0.05ml)について同様な実験を行った。アッセイ混合物中において0.875%の最終濃度(すなわち最高の最終DTAB濃度の5倍)を与えるαCDをアッセイ緩衝液(0.85ml)に含有させることにより、抽出剤を中和した。アッセイは、0.05g/lのルシフェラーゼ(エンザイマティックス社、英国ケンブリッジ)、4g/lのD-ルシフェリン(バイオテックマAB、スウェーデン、ダラロ)、1.00mmol/lの酢酸マグネシウム、0.02mmol/lのピロリン酸四ナトリウム(シグマ・ケミカル・カンパニー、米国ミズーリ州;T6379)および2%のウシ血清アルブミン(A4503、シグマ・ケミカル・カンパニー、米国ミズーリ州)を含有するホタル試薬0.05mlを添加することにより実施された。各アッセイは 10^{-4} mol/l(アッセイ混合物1ml中の最終濃度)のATP標準品の添加により検量された。ATP添加前および添加後の発光測定を1251ルミネーター(バイオオービット・オイ、フィンランド、ツルク)により実施した。2重測定で得た結果(図20)は、抽出物中1.25%のDTAB(等容量の試料および2.5%DTABに相当)が安全性限界において100%ATP収率を与えることを示す。ルーチン用として用いるためにはこの結論をより多数の試料において確認しなければならない。

実施例4

DNAの増幅または増幅反応における抽出剤の中和のためのサイクロデキストリンの使用

この実験においては、細胞溶解後のディタージェントの中和にサイクロデキストリンを使用することにつき調べた。0.5ml PBS(シグマ)中のHeL

a細胞(10^7)を1mlの細胞溶解緩衝液(100mM Tris, pH8; 1mM EDTA; 1% SDS; 0.4mg/ml RNase A; 40U/ml RNase T1)の添加により細胞溶解した。細胞溶解物を55℃で15分間インキュベートしたのち、0.5mlのプロテイナーゼK(ペーリンガー; 600μg/ml)を添加した。55℃で45分間消化を続けた。溶解物のアリコート(200μl)を新鮮な試験管に装入し、αCD(フルカ; H₂O中10%w/v)を下記の量で溶解物に添加した: 10μl、20μl、50μl、100μlおよび200μl。緩和な攪拌により試料を混合したのち、PCRによりDNAの機能活性を分析した。

PCR反応(反応容量50μl)を下記物質の添加により設定した: 10μlの5×PCR緩衝液(50mM Tris, pH8.5; 250mM KCl、7.5mM MgCl₂、1mM dATP、1mM dGTP、1mM dCTP、1mM dTTP); 2μlのCF座プライマー(CT locus primer)(各50μl); 1μlのDNA(αCD処理細胞溶解物または対照DNA); 37μlの無菌H₂O; 2μlのTaqポリメラーゼ(エーメルシヤム)。

反応プロフィールは下記のとおりであった:

93℃ 3分

55℃ 1分 30回

72℃ 2分 " "

93℃ 30秒 " "

55℃ 1分 " "

72℃ 5分

PCR反応の終了後に、試料(20μl)をアガロースゲル電気泳動により分析した(TBE緩衝液中1%アガロース; サムブルック、フリッシュおよびマニアス(J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis

a). Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、1989)。50μlまたは100μlのαCDを添加した細胞溶解物において最大の増幅が達成され、200μlを添加した際にも増幅が達成された。対照(αCDを添加しなかった細胞溶解物)または10μlもしくは20μlのαCDを添加した細胞溶解物においては増幅が生じなかった。

増幅可能な試料が制限酵素による消化も可能であるかを評価するために、下記の実験を行った。50μlおよび100μlのαCDで処理した細胞溶解物をHindIII、EcoRIおよびMspI(エーメルシヤム)により下記に従って消化した: DNA(1.8μl)、緩衝液(2μl)、製造業者により供給されたまま)および酵素(約5U/μg)を混合し、試料を37℃で1時間消化した。試料を上記に従ってアガロースゲル電気泳動により分析した。

制限消化後のαCD処理試料のバンドパターンを調べた。100μlのαCDを添加した試料のみが3種類すべての酵素により消化され、これはこれらがこれらのHeLa細胞溶解物におけるDNAのPCRおよび制限分析双方に最適な中和条件であることを示す。

PCRおよび制限消化実験は、粗製細胞溶解物中においてSDSを中和するためにαCDが有効であり、これらの細胞溶解物中に存在するDNAが機能的に活性であることを示す。

説明

図1: 抽出剤による中和剤の測定。測定は本文の記載に従って実施された。それぞれ曲線上の3地点の後で、中和剤およびホタル試薬を含有する反応混合物約1mlに10μlの抽出剤を添加した。この図は2%DTABによる0.5%αCD(◆)および2%ツイーン80(◇)の測定、ならびに2%BZCによる0.5%βCD(■)および2%ツイーン80(□)の測定を示す。

図2: 各種中和剤の存在下でDTABがディケイ速度および相対発光に及ぼす影響。中和剤の濃度は図中に示される。ディケイ速度(%/分)は下記の記号により示される: ◇(中和剤なし)、□(0.25%サイクロデキストリンまたは

1%ツイーン80)、△(0.50%サイクロデキストリンまたは2%ツイーン80)、および×(0.75%サイクロデキストリンまたは3%ツイーン80)。相対発光(1回目の抽出剤添加の前値に対する%)は下記の記号により示される: ◆(中和剤なし)、■(0.25%サイクロデキストリンまたは1%ツイーン80)、▲(0.50%サイクロデキストリンまたは2%ツイーン80)、および×(0.75%サイクロデキストリンまたは3%ツイーン80)。

図3: 各種中和剤の存在下で、CPCがディケイ速度および相対発光に及ぼす影響。中和剤の濃度および記号は図2の場合と同様(γCDは省略)。

図4: 各種中和剤の存在下で、BACがディケイ速度および相対発光に及ぼす影響。中和剤の濃度および記号は図2の場合と同様(γCDは省略)。

図5: 各種中和剤の存在下で、BZCがディケイ速度および相対発光に及ぼす影響。中和剤の濃度および記号は図2の場合と同様(最高濃度の中和剤は省略)。

図6: 各種中和剤の存在下で、DDAPSがディケイ速度および相対発光に及ぼす影響。中和剤の濃度および記号は図2の場合と同様(最高濃度の中和剤は省略)。

図7: 各種中和剤の存在下で、SDSがディケイ速度および相対発光に及ぼす影響。中和剤の濃度および記号は図2の場合と同様(γCDは省略)。

図8: 中和剤が相対発光に及ぼす影響。中和剤の濃度は下記のとおりである: 0.25、0.50および0.75%サイクロデキストリン(■、αCD: ◆、βCD: ▲、γCD)または1、2および3%ツイーン80(×)。

図9: 0.75%βCDの存在下(◇)および不在下(◆)でルシフェリン濃度がホタル試薬からの相対発光に及ぼす影響。βCDの不在下で0.2g/lのルシフェリンによる発光を100%と設定する。

図10: DTABが、0.75%βCDおよび各種濃度のD-ルシフェリン(◆、0.2g/l: ◇、0.4g/l: ■、0.6g/l: □、0.8g/l)を含有するホタル試薬の相対発光に及ぼす影響。各種試薬にDTABを添加する前の発光を100%と設定する。

図11: 抽出剤濃度が、水中に10倍希釈した綿菌菌の一夜培養物におけるA

ATP収率に及ぼす影響。抽出時間：1分(×)および30分(□)。

図12：抽出剤濃度が、水中に10倍希釈した大腸菌の一夜培養物におけるATP収率に及ぼす影響。抽出時間：1分(×)および30分(□)。

図13：抽出剤濃度が、水中に10倍希釈した枯草菌の一夜培養物におけるATP収率に及ぼす影響。抽出時間：1分(×)および30分(□)。

図14：抽出剤濃度が、水中に10倍希釈したビール酵母の一夜培養物におけるATP収率に及ぼす影響。抽出時間：1分(×)および30分(□)。

図15：抽出剤濃度が、水中に10倍希釈したクロレラ・ブルガリスの一夜培養物におけるATP収率に及ぼす影響。抽出時間：1分(×)および30分(□)。

図16：各種抽出剤を用いた尋常変形菌、枯草菌およびエロモナス・ヒドロフィラにおけるATPの収率。種々の系統の一夜培養物を10倍希釈し、アスコート、5mmol/lのEDTAを含有する等容量の1.0、5または2.5% TCA (□)、BZC (△)またはDTAB (◇)と混合することにより抽出した。BZCを含有する抽出物は4倍(w/w)量のβCDにより中和された。DTABを含有する抽出物は5倍(w/w)量のαCDにより中和された。

図17：各種抽出剤を用いた蛍光菌、緑膿菌およびビール酵母におけるATPの収率。抽出および記号は図16の場合と同様。

図18：各種抽出剤を用いた3種類の藻類培養物におけるATPの収率。抽出および記号は図16の場合と同様。

図19：各種抽出剤を用いた3種類のプロセス水試料におけるATPの収率。抽出および記号は図16の場合と同様。

図20：1.0種類の異なる濃度のDTABで抽出したプロセス水試料におけるATPの収率。3種類の試料につき異なる記号を用いて2回実験を示す。

Fig. 1

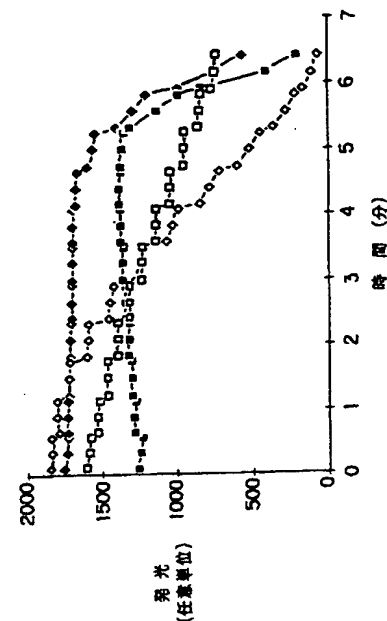


Fig. 2

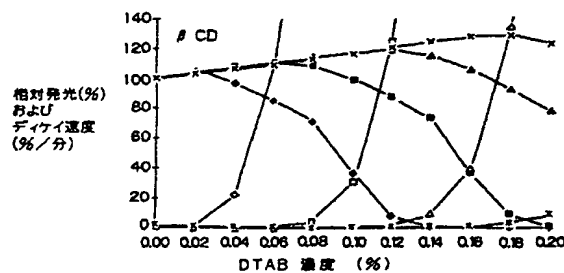
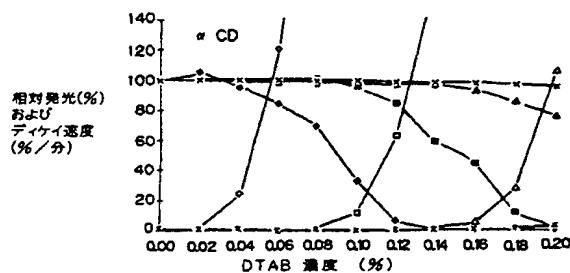


Fig. 2. (Cont.)

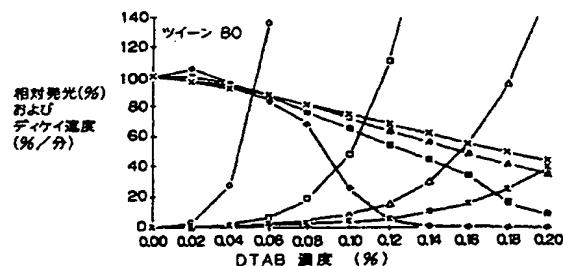
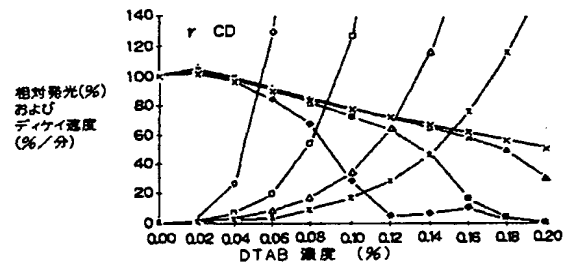


Fig. 3

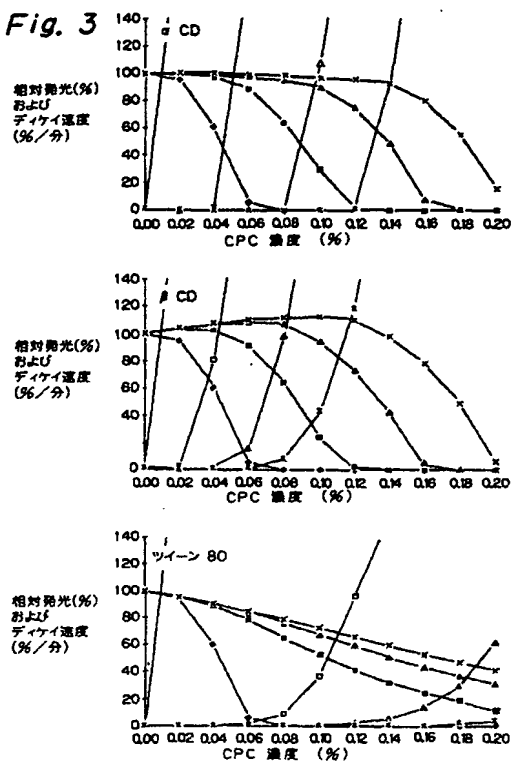


Fig. 4

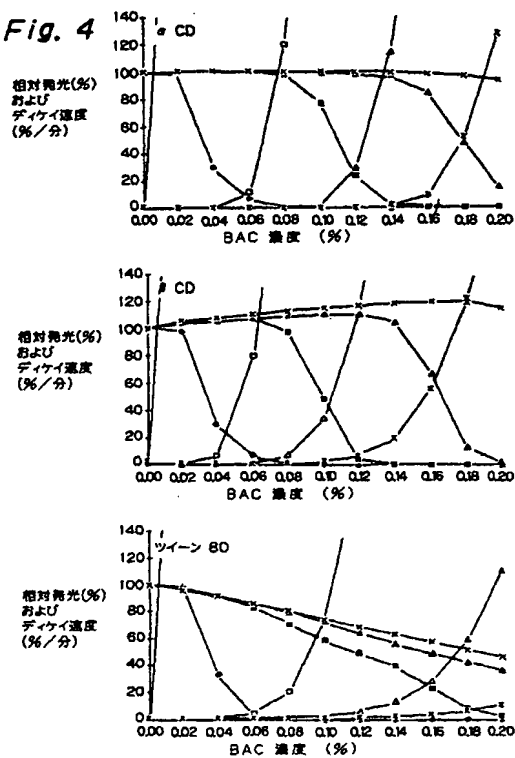


Fig. 5

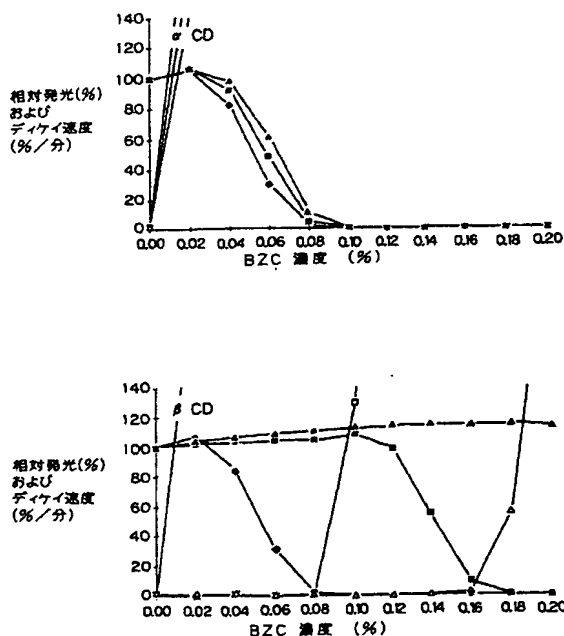


Fig. 5.(Cont.)

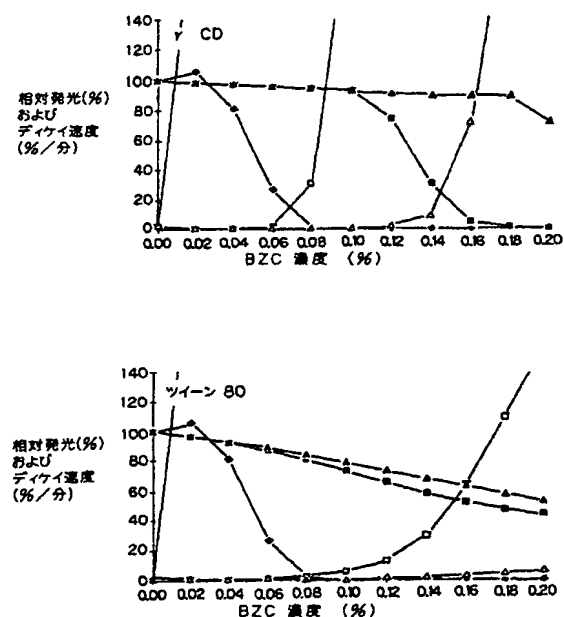


Fig. 6

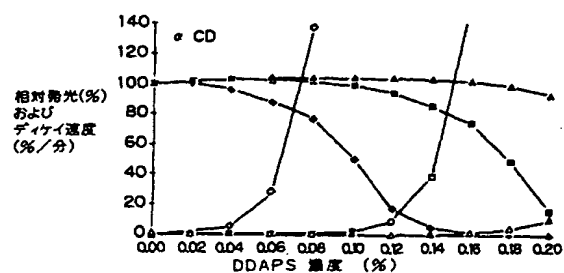


Fig. 6.(Cont.)

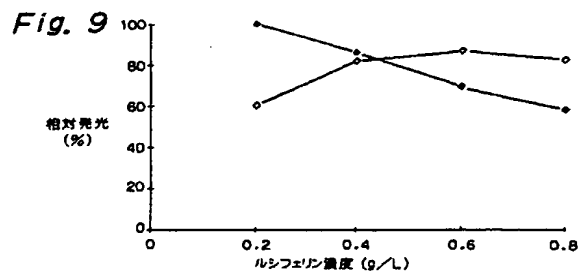
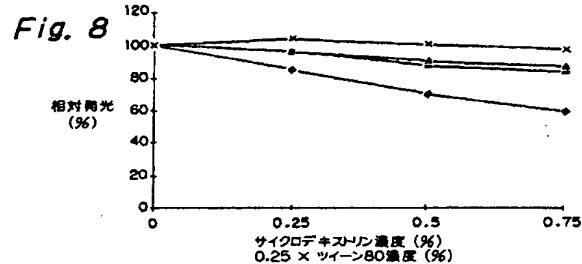
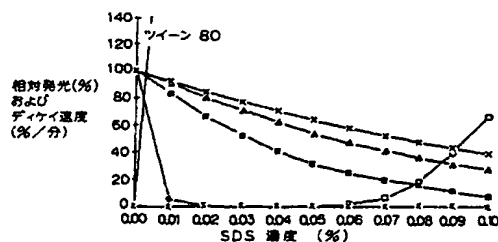
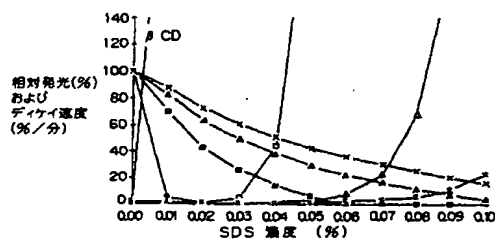
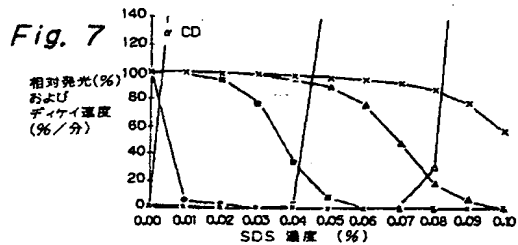
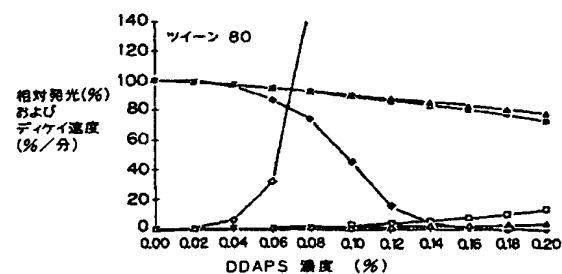
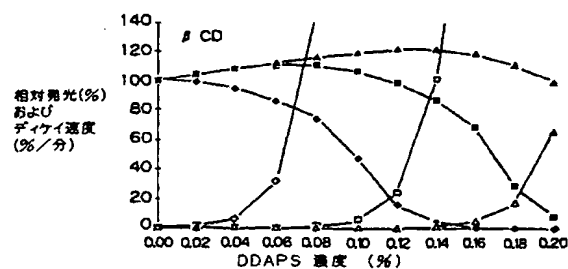
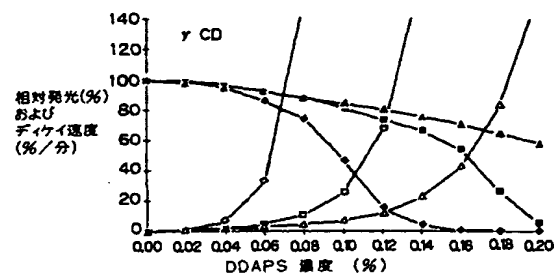


Fig. 10

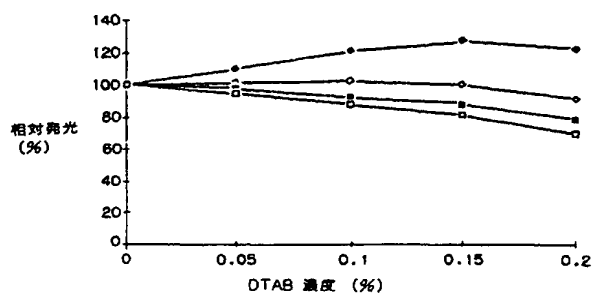


Fig. 11

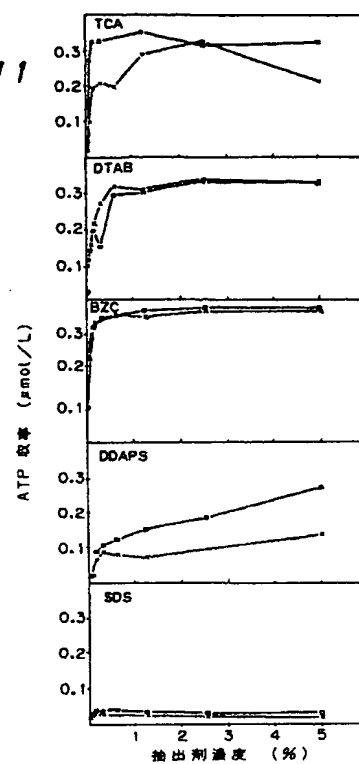


Fig. 12

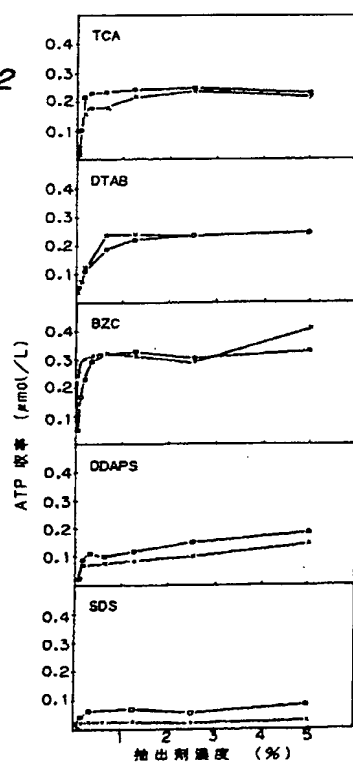


Fig. 13

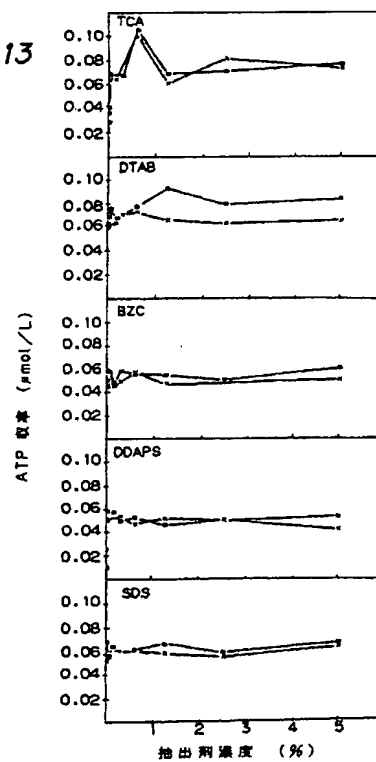


Fig. 14

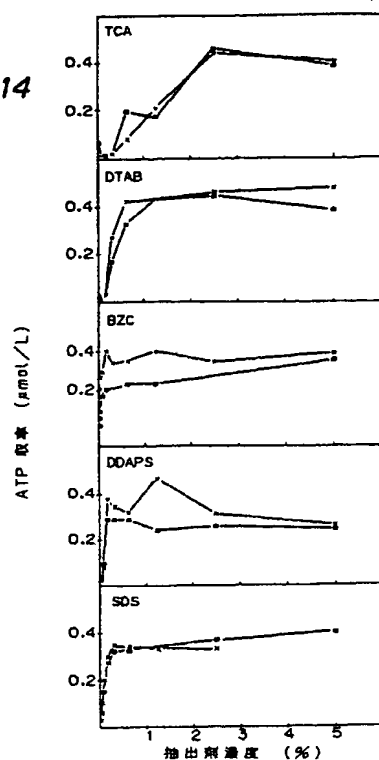


Fig. 15

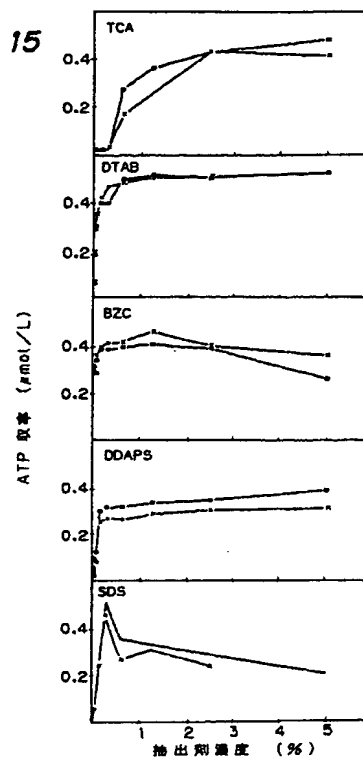


Fig. 16

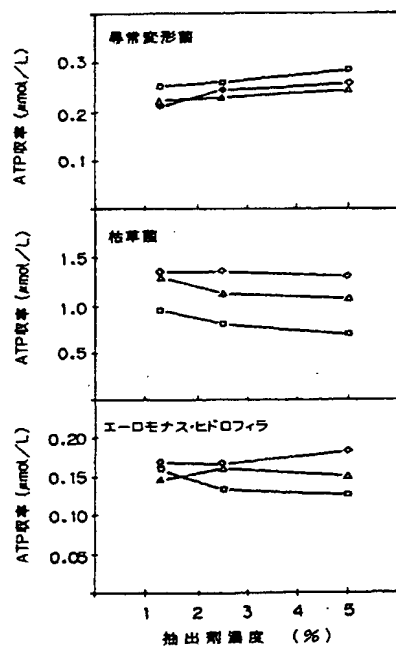
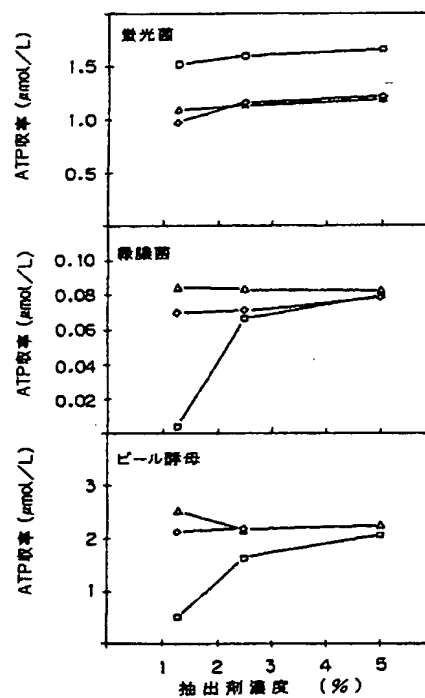


Fig. 17



ミドリムシ

抽出剤濃度 (%)	○ (μmol/L)	△ (μmol/L)	□ (μmol/L)
1	3.5	3.1	3.1
2.5	3.5	3.4	3.4
5	3.5	3.5	3.2

クロレラ・ブルガリス

抽出剤濃度 (%)	○ (μmol/L)	△ (μmol/L)	□ (μmol/L)
1	2.1	1.8	1.0
2.5	2.0	1.8	1.7
5	2.2	1.9	1.9

アナバナ・シリンドリカ

抽出剤濃度 (%)	○ (μmol/L)	△ (μmol/L)	□ (μmol/L)
1	2.6	2.1	3.3
2.5	2.5	2.5	3.2
5	2.5	2.0	3.2

Fig. 19

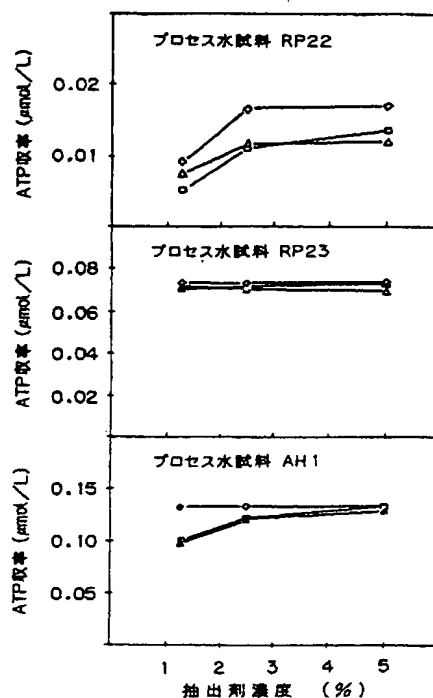
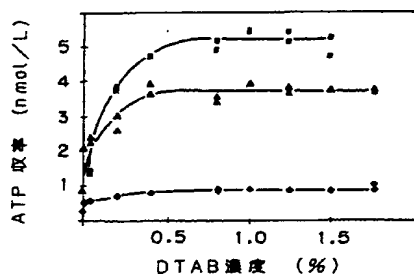


Fig. 20



1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classifications apply, indicate each) Assigning to International Patent Classification (IPC) or to both National Classifications and IPC Int. Cl. 5 C12Q1/00; C12Q1/66; C12Q1/68; C07H1/08		
2. FIELD SEARCHED Minimum Documentation Searched? Classification System: C12Q1; C07H		
Documentation Searched other than Minimum Documentation in the Letter that such Documents are Included in the Public Search?		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*		
Category *	Character of Document, 11 note inclusion, where appropriate, of the relevant paragraph 12	Reference in Class No. 13
Y	EP, A.0 301 847 (MICROGENICS CORPORATION) 1 February 1989 cited in the application abstract see claims 1, 2, 5-10	I-14
Y	DE, A.2 823 916 (S. KOHLMEINER ET AL.) 7 December 1978 cited in the application see the whole document	I-9, I2-14
Y	EP, A.0 286 367 (MICROGENICS CORPORATION) 12 October 1988 cited in the application see abstract see page 2, line 1 - page 4, line 58	I-9, I2-14
* Special categories of cited documents: 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460		

SA DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International Application No.
(CONTINUED FROM THE PREVIOUS PAGE)		PCT/GB 92/00056
Category	Character of Document, and, particularly, when appropriate, of the relevant passage	Reference to Class No.
Y	EP.A.0 309 184 (LUNAC S.V.) 29 March 1989 cited in the application see the whole document	1-9, 12-14
Y	VIROLOGY vol. 93, 1979, NEW YORK (N.Y., US) pages 260 - 264; P.F. PIGNATTI ET AL.: 'Herpes Simplex Virus DNA Isolation from Infected Cells with a Novel Procedure' see abstract see page 260, right column, line 5 - line 15	1-6, 10, 11
P.Y	EP.A.0 428 197 (EASTMAN KODAK COMPANY) 22 May 1991 see the whole document	1-6, 10, 11

See PCT/GB 92/00056 for more details.

This report lists the patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report.
The numbers are as contained in the European Patent Office (EPO) file.
The European Patent Office is to be very careful for those procedures which are merely given for the purpose of information, 14/04/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
EP-A-0301847	01-02-89	JP-A- 1126400	18-05-89
DE-A-2823916	07-12-78	GB-A- 1804249	02-12-81
		CA-A- 1125152	06-06-82
		FR-A,B 2401423	23-03-79
		JP-C- 1521361	12-10-89
		JP-A- 59091900	26-05-84
		JP-B- 62004120	29-01-87
		SE-B- 448100	19-01-87
		SE-A- 7806184	01-12-78
		US-A- 4303752	01-12-81
EP-A-0286367	12-10-88	US-A- 4956274	11-09-90
		AU-B- 609112	28-04-91
		AU-A- 1417488	06-10-88
		JP-A- 1085081	30-03-89
EP-A-0209184	29-03-89	US-A- 5004684	02-04-91
EP-A-0428197	22-05-91	CA-A- 2025845	19-04-91
		JP-A- 3133379	06-05-91

See PCT/GB 92/00056 for more details.

For more details about this report, see: Official Journal of the European Patent Office, No. 12/92